

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局(43) 国际公布日:
2001年5月31日(31.05.2001)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 01/38372 A1

- (51) 国际分类号⁷: C07K 14/435, A61K 38/17 (75) 发明人/申请人(仅对美国): 毛裕民(MAO, Yumin) [CN/CN]; 谢毅(XIE, Yi) [CN/CN]; 中国上海市邯郸路220号科学楼607室, Shanghai 200433 (CN)。
- (21) 国际申请号: PCT/CN00/00479 (74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号, Shanghai 200233 (CN)。
- (22) 国际申请日: 2000年11月20日(20.11.2000) (81) 指定国(国家): JP, US
- (25) 申请语言: 中文 (84) 指定国(地区): 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR)
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权: 99124105.3 1999年11月24日(24.11.1999) CN (84) 指定国(地区): 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR)
- (71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 上海生元基因开发有限公司(SHANGHAI BIORIGIN GENE DEVELOPMENT CO. LTD.) [CN/CN]; 中国上海市北京路668号608室, Shanghai 200001 (CN)
- (72) 发明人;及 本国际公布:
— 包括国际检索报告。
- 所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A NOVEL POLYPEPTIDE-HUMAN PANETH CELL ENHANCED EXPRESSION-LIKE PROTEIN AND THE POLYNUCLEOTIDE ENCODING SAID POLYPEPTIDE

(54) 发明名称: 人的类帕内氏细胞增强表达蛋白及其编码序列

(57) Abstract: The invention discloses a new kind of polypeptide-human Paneth cell enhanced expression-like protein and the polynucleotide encoding said polypeptide and a process for producing the polypeptide by recombinant methods. It also discloses the method of applying the polypeptide for the treatment of various kinds of diseases, such as cancer, polyp of colon, intestinal dysbacteriosis and inflammation. The antagonist of the polypeptide and therapeutic use of the same is also disclosed. In addition, it refers to the use of polynucleotide encoding said human Paneth cell enhanced (PCEELP) expression-like protein.



WO 01/38372 A1



(57) 摘要

本发明公开了一种新的多肽—类帕内特氏细胞增强表达蛋白，编码此多肽的多核苷酸和经重组技术产生这种多肽的方法。本发明还公开了此多肽用于治疗多种疾病的方法，如各种恶性肿瘤，结肠息肉病，肠道菌落混乱和各类炎症等。本发明还公开了抗此多肽的拮抗剂及其治疗作用。本发明还公开了编码这种新的PCEELP的多核苷酸的用途。

人的类帕内特氏细胞增强表达蛋白及其编码序列

发明领域

5 本发明属于生物技术领域，具体地说，本发明描述了一种新的多肽——人的类帕内特氏细胞增强表达蛋白(Paneth cell enhanced expression-like protein, 简称为“PCEELP”)，以及编码此多肽的多核苷酸序列。本发明还涉及此多核苷酸和多肽的制备方法和应用。

发明背景

10 细胞分化是胚胎细胞分裂后未定型的细胞，在形态和生化组成上向专一性或特异性方向进行分化，或由原来较简单具有可塑性的状态向异样化稳定状态进行分化的过程。

成年老鼠小肠上皮有四种主要细胞类型：吸收的肠上皮细胞、肠内分泌细胞，黏液产生的杯形细胞和帕内特氏细胞。这四种细胞都是从隐窝(crypt)的多能干细胞分化而来。前三种细胞高度定向，从隐窝迁移到临近的绒毛，达到最终的分化。而帕内特氏细胞则从干细胞区向下迁移到隐窝基底(Loeffler,M.等人(1993)J.Theor.Biol. 160,471-491)。

由于帕内特氏细胞所处的特殊位置，因此帕内特氏细胞最显著的功能是从其顶端释放颗粒。这种颗粒包含各种消化酶、生长因子、抗生肽，从而影响隐窝多能干细胞小境(niche)的建立和维持，同时也影响着干细胞子代的性质。目前已知帕内特氏细胞蛋白种类较多，如可调节上皮细胞增殖和分化的肿瘤坏死因子 α 、鸟苷蛋白、表皮生长因子；调节微生物群组成，起黏膜屏障作用的防卫素cryptins；抑制肿瘤产生的帕内特氏细胞特有的基质金属蛋白酶matrilysin等等 (Garabedian.等人(1997) JBC online, 272 (38): 23729)。

25 用正常鼠空肠的上皮单链cDNA和辐射去除隐窝的上皮单链cDNA进行差减杂交(subtractive hybridization)，得到了帕内特氏细胞增强表达蛋白PCEE。PCEE表达定位于隐窝，在整个隐窝中的表达是均一的，推测其功能为促进细胞分化和增殖。(Cheng H,等人(1996)Anat Rec, Jan;244(1):78-94)

30 如上所述，帕内特氏细胞表达的蛋白参与包括细胞增殖和分化、菌落调节等的许多病理和生理过程，而且这些过程中涉及大量因子，因而本领域中一直需要鉴定更多参与这些过程的帕内特氏细胞表达的蛋白，特别是鉴定这些蛋白的氨基酸序列。

本发明的一个目的是提供分离的新的多肽——人的类帕内特氏细胞增强表达

蛋白(简称为“PCEELP”)以及其片段、类似物和衍生物。

本发明的另一个目的是提供编码该多肽的多核苷酸。

本发明的另一个目的是提供含有编码PCEELP的多核苷酸的重组载体。

本发明的另一个目的是提供含有编码PCEELP的多核苷酸的基因工程化宿主

5 细胞。

本发明的另一个目的是提供生产PCEELP的方法。

本发明的另一个目的是提供针对本发明的多肽—PCEELP的抗体。

本发明的另一个目的是提供了针对本发明多肽—PCEELP的模拟化合物、拮抗剂、激动剂、抑制剂。

10 本发明的另一个目的是提供诊断和治疗与PCEELP异常相关的疾病的方法。

发明内容

在本发明的第一方面，提供新颖的分离出的PCEELP，该多肽是人源的，它包含：具有SEQ ID NO: 2氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片
15 段、或其活性衍生物、类似物。较佳地，该多肽是具有SEQ ID NO: 2氨基酸序列的多肽。

在本发明的第二方面，提供分离的编码这些多肽的多核苷酸，该多核苷酸包含一核苷酸序列，该核苷酸序列与选自下组的一种核苷酸序列有至少70%相同性：(a)编码上述PCEELP的多核苷酸；(b)与多核苷酸(a)互补的多核苷酸。较佳地，
20 该多核苷酸编码具有SEQ ID NO: 2所示氨基酸序列的多肽。更佳地，该多核苷酸的序列是选自下组的一种：(a)具有SEQ ID NO: 1中310-1206位的序列；和(b)具有SEQ ID NO: 1中1-1938位的序列。

在本发明的第三方面，提供了含有上述多核苷酸的载体，以及被该载体转化或转导的宿主细胞或者被上述多核苷酸直接转化或转导的宿主细胞。

25 本发明的其它方面由于本文的技术的公开，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

下列附图用于说明本发明的具体实施方案，而不用限于由权利要求书所界定的本发明范围。
30

图1是本发明PCEELP和帕内特氏细胞增强表达蛋白PCEE的氨基酸序列同源性比较图。上方序列是PCEELP，下方序列是PCEE。相同氨基酸在两个序列间用单字符氨基酸表示，相似氨基酸用“+”表示。

图2显示了本发明PCEELP的分离纯化的聚丙烯酰胺凝胶电泳图。33kDa为蛋

白质的分子量。箭头所指为分离出的蛋白条带。泳道1为标准分子量蛋白，泳道2和3为分离纯化前的蛋白条带，泳道4为分离纯化后蛋白条带。

本发明实施方式

5 如本发明所用，“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来(如果是天然物质，原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多聚核苷酸和多肽是没有分离纯化的，但同样的多聚核苷酸或多肽如从天然状态中同存在的其他物质中分开，则为分离纯化的。

10 如本文所用，“分离的PCEELP”是指PCEELP基本上不含天然与其相关的其它蛋白、脂类、糖类或其它物质。本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术纯化PCEELP。基本上纯的多肽在非还原聚丙烯酰胺凝胶上能产生单一的主带。PCEELP多肽的纯度能用氨基酸序列分析。

15 本发明提供了一种新的多肽—PCEELP，其基本上是由SEQ ID NO: 2所示的氨基酸序列组成的。本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽，优选重组多肽。本发明的多肽可以是天然纯化的产物，或是化学合成的产物，或使用重组技术从原核或真核宿主(例如，细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。根据重组生产方案所用的宿主，本发明的多肽可以是糖基化的，或可以是非糖基化的。本发明的多肽还可包括或不包括起始的甲硫氨酸残基。

20 本发明还包括PCEELP的片段、衍生物和类似物。如本发明所用，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明的PCEELP相同的生物学功能或活性的多肽。本发明多肽的片段、衍生物或类似物可以是：(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽，而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的，或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽，或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇)融合所形成的多肽，或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列)。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围之内。

25 本发明还提供了分离的编码本发明多肽的核酸(多核苷酸)。在一个实例中，该核酸基本由编码具有SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的多肽的多核苷酸组成。一种优选的本发明多核苷酸序列包括SEQ ID NO: 1的核苷酸序列，该多核苷酸是从人胎脑组织的cDNA文库中发现的。它包含的多核苷酸序列全长为1938个碱基，其开放读框(310-1206)编码具有298氨基酸的人PCEELP蛋白。根据氨基酸序列同源比较发现，此多肽与大鼠小肠组织中的PCEE有89%的同源性，可推断出该新的人

PCEELP具有与PCEE相似的结构和功能。

本发明的多核苷酸可以是DNA形式或是RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。编码成熟多肽的编码区序列可以与SEQ ID NO:1所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本发明所用, “简并的变异体”在本发明中是指编码具有SEQ ID NO:2的蛋白质或多肽, 但与SEQ ID NO:1所示的编码区序列有差别的核酸序列。

编码SEQ ID NO:2的成熟多肽的多核苷酸包括: 只有成熟多肽的编码序列; 成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列; 成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

术语“编码多肽的多核苷酸”是指包括编码此多肽的多核苷酸和包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

本发明还涉及上述多核苷酸的变异体, 其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的片段、类似物和衍生物。此多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的, 等位变异体是一种多核苷酸的替换形式, 它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入, 但不会从实质上改变其编码的多肽的功能。

本发明还涉及与以上所描述的序列杂交的多核苷酸(两个序列之间具有至少50%, 优选具有70%的相同性)。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中, “严格条件”是指: (1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱, 如0.2×SSC, 0.1%SDS, 60℃; 或(2)杂交时添加变性剂, 如50%(v/v)甲酰胺, 0.1%小牛血清/0.1%Ficoll, 42℃等; 或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在95%以上, 更好是97%以上时才发生杂交。并且, 可杂交的多核苷酸编码的多肽与SEQ ID NO: 2所示的成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

本发明还涉及与以上所描述的序列杂交的核酸片段。如本发明所用, “核酸片段”的长度至少含10个核苷酸, 较好是至少30个核苷酸, 更好是至少50个核苷酸, 最好是至少100个核苷酸以上。核酸片段也可用于核酸的扩增技术(如PCR)以确定和/或分离编码PCEELP的多核苷酸。

本发明中的多肽和多核苷酸优选以分离的形式提供, 更佳地被纯化至均质。

本发明的编码PCEELP的特异的多核苷酸序列能用多种方法获得。例如, 用本领域熟知的杂交技术分离多核苷酸。这些技术包括但不限于: 1)用探针与基因组或cDNA文库杂交以检出同源的多核苷酸序列, 和2)表达文库的抗体筛选以检出具有共同结构特征的克隆的多核苷酸片段。

本发明的DNA片段序列也能用下列方法获得：1)从基因组DNA分离双链DNA序列；2)化学合成DNA序列以获得所述多肽的双链DNA。

上述提到的方法中，分离基因组DNA最不常用。DNA序列的直接化学合成是经常选用的方法。更经常选用的方法是cDNA序列的分离。分离感兴趣的cDNA的标准方法是从高表达该基因的供体细胞分离mRNA并进行逆转录，形成质粒或噬菌体cDNA文库。提取mRNA的方法已有多种成熟的技术，试剂盒也可从商业途径获得(Qiagene)。而构建cDNA文库也是通常的方法(Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989)。还可得到商业供应的cDNA文库，如Clontech公司的不同cDNA文库。当结合使用聚合酶链反应技术时，即使极少的表达产物也能克隆。

可用常规方法从这些cDNA文库中筛选本发明的基因。这些方法包括(但不限于)：(1)DNA-DNA或DNA-RNA杂交；(2)标志基因功能的出现或丧失；(3)测定PCEELP转录本的水平；(4)通过免疫学技术或测定生物学活性，来检测基因表达的蛋白产物。上述方法可单用，也可多种方法联合应用。

在第(1)种方法中，杂交所用的探针是与本发明的多核苷酸的任何一部分同源，其长度至少10个核苷酸，较好是至少30个核苷酸，更好是至少50个核苷酸，最好是至少100个核苷酸。此外，探针的长度通常在2000个核苷酸之内，较佳的为1000个核苷酸之内。此处所用的探针通常是在本发明的基因序列信息的基础上化学合成的DNA序列。本发明的基因本身或者片段当然可以用作探针。DNA探针可用放射性同位素、荧光素或酶(如碱性磷酸酶)等进行标记。

在第(4)种方法中，检测PCEELP基因表达的蛋白产物可用免疫学技术如Western印迹法，放射免疫沉淀法，酶联免疫吸附法(ELISA)等。

应用PCR技术扩增DNA/RNA的方法(Saiki, et al. Science 1985;230:1350-1354)被优选用于获得本发明的基因。特别是很难从文库中得到全长的cDNA时，可优选使用RACE法(RACE-cDNA末端快速扩增法)。用于PCR的引物可根据本文所公开的本发明的多核苷酸序列信息适当地选择，并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的DNA/RNA片段。

如上所述得到的本发明的基因或其各种DNA片段的核苷酸序列，可用常规方法如双脱氧链终止法(Sanger et al. PNAS, 1977, 74: 5463-5467)测定。这类多核苷酸序列测定也可用商业测序试剂盒。为了获得全长的cDNA序列，测序需反复进行。有时需要测定多个克隆的cDNA序列，才能拼接成全长的cDNA序列。

本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体，以及用本发明的载体或直接用PCEELP编码序列经基因工程产生的宿主细胞，以及经重组技术产生本发明所述多肽的方法。

本发明中，编码PCEELP的多核苷酸序列可插入到载体中，以构成含有本发明所述多核苷酸的重组载体。术语“载体”指本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒或其它载体。在本发明中适用的载体包括但不限于：在细菌中表达的基于T7启动子的表达载体
5 (Rosenberg, et al. Gene, 1987, 56:125)；在哺乳动物细胞中表达的pMSXND表达载体(Lee and Nathans, J Bio Chem. 263:3521,1988)和在昆虫细胞中表达的来源于杆状病毒的载体。总之，只要能在宿主体内复制和稳定，任何质粒和载体都可以用于构建重组表达载体。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起始点、启动子、标记基因和翻译调控元件。

10 本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含编码PCEELP的DNA序列和合适的转录/翻译调控元件的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术、DNA合成技术、体内重组技术等(Sambrook, et al. Molecular Cloning, a Laboratory Manual, cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1989)。所述的DNA序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上，以指导mRNA合成。这些启动子的代表性例子有：大
15 肠杆菌的lac或trp启动子； λ 噬菌体的PL启动子；真核启动子包括CMV立即早期启动子、HSV胸苷激酶启动子、早期和晚期SV40启动子、反转录病毒的LTRs和其它一些已知的可控制基因在原核细胞或真核细胞或其病毒中表达的启动子。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子等。在载体中插入增强子序列将会使其在高等真核细胞中的转录得到增强。增强子是DNA表达的顺式作用因子，通常大约有10到300个碱基对，作用于启动子以增强基因的转录。可举
20 的例子包括在复制起始点晚期一侧的100到270个碱基对的SV40增强子、在复制起始点晚期一侧的多瘤增强子以及腺病毒增强子等。

此外，表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以
25 及绿色荧光蛋白(GFP)，或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性等。

本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体/转录调控元件(如启动子、增强子等)和选择性标记基因。

本发明中，编码PCEELP的多核苷酸或含有该多核苷酸的重组载体可转化或转导入宿主细胞，以构成含有该多核苷酸或重组载体的基因工程化宿主细胞。术语“宿主细胞”指原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属；细菌
30 细胞如鼠伤寒沙门氏菌；真菌细胞如酵母；植物细胞；昆虫细胞如果蝇S2或Sf9；动物细胞如CHO、COS或Bowes黑素瘤细胞等。

用本发明所述的DNA序列或含有所述DNA序列的重组载体转化宿主细胞可

用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收DNA的感受态细胞可在指数生长期后收获，用CaCl₂法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是用MgCl₂进行处理。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的DNA转染方法：磷酸钙共沉淀法，或者常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

通过常规的重组DNA技术(Science, 1984; 224: 1431)，利用本发明的多核苷酸序列可用来表达或生产重组的PCEELP。一般来说有以下步骤：

(1).用本发明的编码人 PCEELP的多核苷酸(或变异体)，或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞；

(2).在合适的培养基中培养宿主细胞；

(3).从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

在步骤(2)中，根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在步骤(3)中，重组多肽可包被于细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法包括但不限于：常规的复性处理、蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超声波处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

基于本发明PCEELP与已知PCEE的相似性，PCEELP或编码它的多核苷酸可用于调节细胞增殖、细胞分化、菌落调节等。本发明多肽的拮抗剂或反义多核苷酸可能用于治疗肿瘤、结肠息肉病等。

因此，给予包括人和动物受试者治疗有效剂量的PCEELP、其生物活性衍生物或激动剂，可治疗、缓解和/或预防选自下列的疾病：肠道菌落混乱、细胞信号传导紊乱所引起疾病。

给予包括人和动物受试者治疗有效剂量的PCEELP拮抗剂或抑制剂，可治疗、缓解和/或预防选自下列的疾病：癌症，包括但不限于腺癌、结肠癌等；结肠息肉病等。

本发明也提供了筛选化合物以鉴定提高(激动剂)或阻遏(拮抗剂)PCEELP的药剂的方法。激动剂提高PCEELP刺激细胞增殖等生物功能，而拮抗剂阻止和治疗与细胞过度增殖有关的紊乱如各种癌症。例如，能在药物的存在下，将哺乳动物细胞与标记的本发明蛋白一起培养。然后测定药物提高或阻遏本发明蛋白的能

力。

PCEELP的拮抗剂包括筛选出的抗体、化合物、受体缺失物和类似物等。PCEELP的拮抗剂可以与PCEELP多肽结合并消除其功能，或是抑制该多肽的产生，或是与该多肽的活性位点结合使该多肽不能发挥生物学功能。

5 在筛选作为拮抗剂的化合物时，可以将PCEELP加入生物分析测定中，通过测定化合物对PCEELP和其受体之间相互作用的影响来确定化合物是否是拮抗剂。用上述筛选化合物的同样方法，可以筛选出起拮抗剂作用的受体缺失物和类似物。能与PCEELP结合的多肽分子可通过筛选由各种可能组合的氨基酸结合于固相物组成的随机多肽库而获得。筛选时，一般应对PCEELP分子进行标记。

10 本发明提供了用多肽，及其片段、衍生物、类似物或它们的细胞作为抗原以生产抗体的方法。这些抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。本发明还提供了针对PCEELP抗原决定簇的抗体。这些抗体包括(但不限于)：多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、Fab片段和Fab表达文库产生的片段。

多克隆抗体的生产可用PCEELP直接注射免疫动物(如家兔，小鼠，大鼠等)的方法得到。有多种佐剂可用于增强免疫反应，包括但不限于弗氏佐剂等。制备PCEELP的单克隆抗体的技术包括但不限于：杂交瘤技术(Kohler and Milstein, Nature, 1975, 256:495-497)，三瘤技术，人B-细胞杂交瘤技术，EBV-杂交瘤技术等。将人恒定区和非人源的可变区结合的嵌合抗体可用已有的技术生产(Morrison et al, PNAS, 1985, 81:6851)。而已有的生产单链抗体的技术(U.S. Pat No. 4946778)也可用于生产抗PCEELP的单链抗体。

20 抗PCEELP的抗体可用于免疫组织化学技术中，检测活检标本中的PCEELP。

与PCEELP结合的单克隆抗体也可用放射性同位素标记，注入体内可跟踪其位置和分布。这种放射性标记的抗体可作为一种非创伤性诊断方法用于肿瘤细胞的定位和判断是否有转移。

25 抗体还可用于设计针对体内某一特殊部位的免疫毒素。如PCEELP高亲和性的单克隆抗体可与细菌或植物毒素(如白喉毒素，蓖麻蛋白，红豆碱等)共价结合。一种通常的方法是用巯基交联剂如SPDP，攻击抗体的氨基，通过二硫键的交换，将毒素结合于抗体上，这种杂交抗体可用于杀灭PCEELP阳性的细胞。

本发明中的抗体可用于治疗或预防与PCEELP相关的疾病。给予适当剂量的抗体可以刺激或阻断PCEELP的产生或活性。

30 本发明还涉及定量和定位检测PCEELP水平的诊断试验方法。这些试验是本领域所熟知的，且包括FISH测定和放射免疫测定。试验中所检测的PCEELP水平，可以用作解释PCEELP在各种疾病中的重要性和用于诊断PCEELP起作用的疾病。

本发明的多肽还可用作肽谱分析。例如，多肽可用物理的、化学或酶进行特异性切割，并进行一维或二维或三维的凝胶电泳分析，更好的是进行质谱分析。

5 编码PCEELP的多核苷酸也可用于多种治疗目的。基因治疗技术可用于治疗由于PCEELP的无表达或异常/无活性表达所致的细胞增殖、发育或代谢异常。重组的基因治疗载体(如病毒载体)可设计用于表达变异的PCEELP，以抑制内源性的PCEELP活性。例如，一种变异的PCEELP可以是缩短的、缺失了信号传导功能域的PCEELP，虽可与下游的底物结合，但缺乏信号传导活性。因此重组的基因治疗载体可用于治疗PCEELP表达或活性异常所致的疾病。来源于病毒的表达载体如逆转录病毒、腺病毒、腺病毒相关病毒、单纯疱疹病毒、细小病毒等可用于将
10 编码PCEELP的多核苷酸转移至细胞内。构建携带编码PCEELP的多核苷酸的重组病毒载体的方法可见于已有文献(Sambrook, et al.)。另外重组编码PCEELP的多核苷酸可包装到脂质体中然后再转移至细胞内。

多核苷酸导入组织或细胞内的方法包括：将多核苷酸直接注入到体内组织中；或在体外通过载体(如病毒、噬菌体或质粒等)先将多核苷酸导入细胞中，再
15 将细胞移植到体内等。

抑制PCEELP mRNA的寡核苷酸(包括反义RNA和DNA)以及核酶也在本发明的范围之内。核酶是一种能特异性分解特定RNA的酶样RNA分子，其作用机制是核酶分子与互补的靶RNA特异性杂交后进行核酸内切作用。反义的RNA和DNA及核酶可用已有的任何RNA或DNA合成技术获得，如固相磷酸酰胺化学合成法合
20 成寡核苷酸的技术已广泛应用。反义RNA分子可通过编码该RNA的DNA序列在体外或体内转录获得。这种DNA序列已整合到载体的RNA聚合酶启动子的下游。为了增加核酸分子的稳定性，可用多种方法对其进行修饰，如增加两侧的序列长度，核糖核苷之间的连接应用磷酸硫酯键或肽键而非磷酸二酯键。

编码PCEELP的多核苷酸可用于诊断与PCEELP相关的疾病。编码PCEELP的
25 多核苷酸可用于检测PCEELP的表达与否或在疾病状态下PCEELP的异常表达。如编码PCEELP的DNA序列可用于对活检标本进行杂交以判断PCEELP的表达状况。杂交技术包括Southern印迹法，Northern印迹法、原位杂交等。这些技术方法都是公开的成熟技术，相关的试剂盒都可从商业途径得到。本发明的多核苷酸的一部分或全部可作为探针固定在微阵列(Microarray)或DNA芯片(又称为“基因芯
30 片”)上，用于分析组织中基因的差异表达分析和基因诊断。用PCEELP特异的引物进行RNA-聚合酶链反应(RT-PCR)体外扩增也可检测PCEELP的转录产物。

检测PCEELP基因的突变也可用于诊断PCEELP相关的疾病。PCEELP突变的形式包括与正常野生型PCEELP DNA序列相比的点突变、易位、缺失、重组和其它任何异常等。可用已有的技术如Southern印迹法、DNA序列分析、PCR和原位

杂交检测突变。另外,突变有可能影响蛋白的表达,因此用Northern印迹法、Western印迹法可间接判断基因有无突变。

本发明的序列对染色体鉴定也是有价值的。该序列会特异性地针对某条人染色体具体位置且并可以与其杂交。目前,需要鉴定染色体上的各基因的具体位点。然而,现在只有很少的基于实际序列数据(重复多态性)的染色体标记物可用于标记染色体位置。根据本发明,为了将这些序列与疾病相关基因相关联,其重要的第一步就是将这些DNA序列定位于染色体上。

简而言之,根据cDNA制备PCR引物(优选15-35bp),可以将序列定位于染色体上。然后,将这些引物用于PCR筛选含各条人染色体的体细胞杂合细胞。只有那些含有相应于引物的人基因的杂合细胞会产生扩增的片段。

体细胞杂合细胞的PCR定位法,是将DNA定位到具体染色体的快捷方法。使用本发明的寡核苷酸引物,通过类似方法,可利用一组来自特定染色体的片段或大量基因组克隆而实现亚定位。可用于染色体定位的其它类似策略包括原位杂交、用标记的流式分选的染色体预筛选和杂交预选,从而构建染色体特异的cDNA库。

将cDNA克隆与中期染色体进行荧光原位杂交(FISH),可以在一个步骤中精确地进行染色体定位。此技术的综述,参见Verma等, Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York(1988)。

一旦序列被定位到准确的染色体位置,此序列在染色体上的物理位置就可以与基因图数据相关联。这些数据可见于例如, V.Mckusick, Mendelian Inheritance in Man(可通过与Johns Hopkins University Welch Medical Library联机获得)。然后通过连锁分析,确定基因与业已定位到染色体区域上的疾病之间的关系。

接着,需要测定患病和未患病个体间的cDNA或基因组序列差异。如果在一些或所有的患病个体中观察到某突变,而该突变在任何正常个体中未观察到,则该突变可能是疾病的病因。比较患病和未患病个体,通常涉及首先寻找染色体中结构的变化,如从染色体水平可见的或用基于cDNA序列的PCR可检测的缺失或易位。根据目前的物理作图和基因定位技术的分辨能力,被精确定位至与疾病有关的染色体区域的cDNA,可以是50至500个潜在致病基因间之一种(假定1兆碱基作图分辨能力和每20kb对应于一个基因)。

可以将本发明的多肽、多核苷酸及其模拟物、激动剂、拮抗剂和抑制剂与合适的药物载体组合后使用。这些载体可以是水、葡萄糖、乙醇、盐类、缓冲液、甘油以及它们的组合。组合物包含安全有效量的多肽或拮抗剂以及不影响药物效果的载体和赋形剂。这些组合物可以作为药物用于疾病治疗。

本发明还提供含有一种或多种容器的药盒或试剂盒,容器中装有一种或多种

本发明的药用组合物成分。与这些容器一起，可以有由制造、使用或销售药品或生物制品的政府管理机构所给出的指示性提示，该提示反映出生产、使用或销售的政府管理机构许可其在人体上施用。此外，本发明的多肽可以与其它的治疗化合物结合使用。

5 药物组合物可以以方便的方式给药，如通过局部、静脉内、腹膜内、肌内、皮下、鼻内或皮内的给药途径。PCEELP以有效地治疗和/或预防具体的适应症的量来给药。施用于患者的PCEELP的量和剂量范围将取决于许多因素，如给药方式、待治疗者的健康条件和诊断医生的判断。

10 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如Sambrook等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

15 实施例1: PCEELP cDNA的克隆

用异硫氰酸胍/酚/氯仿一步法提取人胎脑总RNA。用Quick mRNA分离试剂盒(Qiagen 公司产品)从总RNA中分离poly(A)mRNA。2ug poly(A)mRNA经逆转录形成cDNA。用Smart cDNA克隆试剂盒(购自Clontech)将cDNA片段定向插入到pBSK(+)载体(Clontech公司产品)的多克隆位点上，转化DH5 α 细菌形成cDNA文库。用Dye Terminate Cycle Reaction测序试剂盒(Perkin-Elmer公司产品)和ABI 377自动测序仪(Perkin-Elmer公司)测定所有克隆的5'和3'末端的序列。将测定的cDNA序列与已有的公共DNA序列数据库(Genbank)进行比较，结果发现其中一个克隆(0978h02)的cDNA序列为新的DNA。通过合成一系列引物对该克隆所含的插入cDNA片段进行双向测定。结果表明，0978h02克隆所含的全长cDNA为1938bp(如SEQ ID NO:1 所示)，从第310bp至1206bp有一个897bp的开放阅读框架(ORF)，编码一个新的蛋白质(如SEQ ID NO: 2所示)。此克隆被命名为pBS-0978h02，编码的蛋白质命名为PCEELP。

20

25

实施例2: cDNA 克隆的同源检索

30 将本发明的人PCEELP基因的序列及其编码的蛋白序列，用Blast程序(Basic Local Alignment search tool)[Altschul, SF et al. J. Mol. Biol.1990; 215: 403-10]，在Genbank、Swissport等数据库进行同源检索。与本发明的人PCEELP基因同源性最高的基因是一种已知的帕内特氏细胞增强表达蛋白(Paneth cell enhanced expression蛋白，简称为“PCEE”)的基因，其编码的蛋白在Genbank的

准入号为U37351。蛋白质同源结果示于图1，两者高度同源，其相同性为89%；相似性为92%。根据GCG version 10.0 软件包的Spscan程序和McGeoch Scan推测PCEELP为分泌蛋白，其信号肽位置为1-31。

5 实施例3: 用RT-PCR方法克隆PCEELP基因

用胎脑细胞总RNA为模板，以oligo-dT为引物进行逆转录反应合成cDNA，用Qiagene的试剂盒纯化后，用下列引物进行PCR扩增：

引物1：5'-GGGAAAAGTAAAGTTAAAGTCGGTTCTCT-3' (SEQ ID NO. 3)

引物2：5'-GAGTGGAGAGAGTTGTGTTTATTCACCATG-3' (SEQ ID NO. 4)

10 引物1对应于位于SEQ ID NO:1的5'端的第1bp开始的正向序列；

引物2对应于SEQ ID NO:1中的3'端反向序列。

扩增反应的条件：在50 μ l的反应体积中含有50mmol/L KCl, 10mmol/L Tris-Cl, (pH8.5), 1.5mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTP, 10pmol引物, 1U的Taq DNA聚合酶(Clontech公司产品)。在PE9600型DNA热循环仪(Perkin-Elmer公司)上按下列条件

15 反应25个周期：94 $^{\circ}$ C 30sec；55 $^{\circ}$ C, 30sec；72 $^{\circ}$ C 2min。在RT-PCR时同时设 β -肌动蛋白为阳性对照和模板空白为阴性对照。扩增产物用QIAGEN公司的试剂盒纯化，用TA克隆试剂盒连接到pCR载体上(Invitrogen公司产品)。DNA序列分析结果表明PCR产物的DNA序列与SEQ ID NO:1所示的1-1938bp完全相同。

20 实施例4: Northern 印迹法分析PCEELP基因的表达：

用一步法提取总RNA[Anal. Biochem 1987, 162, 156-159]。该法包括酸性硫氰酸胍苯酚-氯仿抽提。即用4M异硫氰酸胍-25mM柠檬酸钠, 0.2M乙酸钠(pH4.0)对组织进行匀浆，加入1倍体积的苯酚和1/5体积的氯仿-异戊醇(49:1)，混合后离心。吸出水相层，加入异丙醇(0.8体积)并将混合物离心得到RNA沉淀。将得到的RNA

25 沉淀用70%乙醇洗涤，干燥并溶于水中。

用20 μ g RNA，在含20mM 3-(N-吗啉代)丙磺酸(pH7.0)-5mM乙酸钠-1mM EDTA-2.2M甲醛的1.2%琼脂糖凝胶上进行电泳。然后转移至硝酸纤维素膜上。用 α -³²P dATP通过随机引物法制备³²P-标记的DNA探针。所用的DNA探针为PCR扩增的PCEELP编码区序列(310bp至1206bp)。将³²P-标记的探针(约2 \times 10⁶cpm/ml)与

30 转移了RNA的硝酸纤维素膜在一溶液中共于42 $^{\circ}$ C杂交过夜，该溶液包含50%甲酰胺-25mM KH₂PO₄(pH7.4)-5 \times SSC-5 \times Denhardt's溶液和200 μ g/ml鲑精DNA。杂交之后，将滤膜在1 \times SSC-0.1%SDS中于55 $^{\circ}$ C洗30min。然后，用Phosphor Imager进行分析和定量。

实例5: 重组PCEELP的体外表达、分离和纯化

根据SEQ ID NO:1的编码区序列, 设计出一对特异性扩增引物, 序列如下:

引物3: 5' -CATATGATGAACGACAGCCTTCGCACCGACG-3' (SEQ ID No 5)

引物4: 5' -GGATCCAACCCCGCCTCACCTCCGATGCCTGCT-3' (SEQ ID No 6)

- 5 此两段引物的5'端分别含有NdeI和BamHI酶切位点, 其后分别为目的基因5'端和3'端的编码序列, NdeI和BamHI酶切位点相应于表达载体质粒pET-28b(+)(Novagen 公司产品, Cat.No.69865.3)上的选择性内切酶位点。以含有全长目的基因的pBS-0978h02质粒为模板, 进行PCR反应。PCR反应条件为: 总体积50 μ l 中含pBS-0978h02质粒10pg、引物-3和引物-4分别为10pmmol、Advantage
- 10 polymerase Mix (Clontech公司产品)1 μ l。循环参数: 94 $^{\circ}$ C 20s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 共25个循环。用NdeI和BamHI分别对扩增产物和质粒pET-28(+)进行双酶切, 分别回收大片段,并用T4连接酶连接。连接产物转化用氯化钙法大肠杆菌DH5 α , 在含卡那霉素(终浓度30 μ g/ml)的LB平板培养过夜后,用菌落PCR方法筛选阳性克隆, 并进行测序。挑选序列正确的阳性克隆(pET-0978h02)用氯化钙法将重组质粒
- 15 转化大肠杆菌BL21(DE3)plySs(Novagen公司产品)。在含卡那霉素(终浓度30 μ g/ml)的LB液体培养基中, 宿主菌BL21(pET-0978h02)在37 $^{\circ}$ C培养至对数生长期, 加入IPTG至终浓度1mmol/L, 继续培养5小时。离心收集菌体, 经超声波破菌, 离心收集上清, 用能与6个组氨酸(6His-Tag)结合的亲和层析柱His.Bind Quick Cartridge(Novagen公司产品)进行层析, 得到了纯化的目的蛋白PCEELP。经SDS-
- 20 PAGE电泳, 在33kDa处得到一单一的条带(图2)。将该条带转移至PVDF膜上用Edams水解法进行N-端氨基酸序列分析, 结果N-端15个氨基酸与SEQ ID NO:2所示的N-端15个氨基酸残基完全相同。

实施例6: 抗PCEELP抗体的产生

- 25 用多肽合成仪(PE公司产品)合成下述PCEELP特异性的多肽:

NH₂-Met-Asn-Asp-Ser-Leu-Arg-Thr-Asp-Val-Phe-Val-Arg-Phe-Gln-Pro-COOH (SEQ ID NO:7)。

- 30 将该多肽分别与血蓝蛋白和牛血清白蛋白耦合形成复合, 方法参见: Avrameas, et al. Immunochemistry,1969; 6:43。用4mg上述血蓝蛋白多肽复合物加上完全弗氏佐剂免疫家兔, 15天后再用血蓝蛋白多肽复合物加不完全弗氏佐剂加强免疫一次。采用经15 μ g/ml牛血清白蛋白多肽复合物包被的滴定板做ELISA测定兔血清中抗体的滴度。用蛋白A-Sepharose从抗体阳性的家兔血清中分离总IgG。将多肽结合于溴化氰活化的Sepharose 4B柱上, 用亲和层析法从总IgG中分离抗多肽抗体。免疫沉淀法证明纯化的抗体可特异性地与PCEELP结合。

实施例7: PCEELP的反义寡核苷酸抑制HL-60细胞的增殖

采用392型DNA合成仪自动合成PCEELP的反义寡核苷酸(AS-ODN)和正义寡核苷酸(S-ODN),并以二硫化四乙基秋兰姆(Tetraethylthiuram disulfide, TETD)进行化学修饰而成为AS-PS-ODN和S-PS-ODN,其碱基序列为:

AS-PS-ODN: 5'-CGGTGCGAAGGCTGTCGTTTCATGTAA-3' (SEQ ID NO. 8)

S-PS-ODN: 5'-TTACATGAACGACAGCCTTCGCACCG-3' (SEQ ID NO. 9)

将浓度为 5×10^5 的HL-60细胞分为3组在37°C、5%CO₂培养箱中培养:(1)对照组为单纯HL-60细胞;(2)HL-60细胞+AS-PS-ODN;(3)HL-60细胞+S-PS-ODN。

AS-PS-ODN或S-PS-ODN的终浓度为20μg/ml。细胞培养24小时后用台盼蓝染色检测细胞的死亡率。结果表明,将AS-PS-ODN组细胞死亡率为92.5%,而对照组和S-PS-ODN组死亡率为5%。表明PCEELP基因的反义寡核苷酸能有效地抑制HL-60细胞的增殖。

序 列 表

(1)一般信息:

(i)申请人:

(A)姓名: 上海生元基因开发有限公司

(B)街道: 北京东路668号610室

(C)城市: 上海

(D)国家: 中国

(E)邮政编码: 200001

(ii)发明名称: 人的类帕内特氏细胞增强表达蛋白及其编码序列

(iii)序列数目:9

(2)SEQ ID NO: 1的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 1938bp

(B)类型: 核酸

(C)链性: 双链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: cDNA

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 1:

GGGAAAAGT AAAGTTAAAG TCGGTTCTCT TTCATAGCAA CACGTATTGT CTGACATTCAG 60
CCAGCTTTT TTTTTTCTA ATAATTTCTG TGCCTTTCTG TCCTGTATTT ACTGTATTTAG 120
AAAAAGCAGC TAGAATATTT CTCCATTAAC TCTTGAGATT CACAGGACTG TCTAGCTCTG 180
AGTCCTAGCA ATAGACTCCT TAGAGGAGTA GTACGTTTAT CTAGATTTTC TCTAGATAAT 240
GCAGGCGGAA GACCTGGGT CCCGGGTGGG GCATTGCAGT TCTTCCTGTG TTTGGCTTCC 300
AGGAATTACA TGAACGACAG CCTTCGCACC GACGTCTTCG TCGGTTCCA GCCAGAGAGC 360
ATCGCCTGTG CCTGCATTTA TCTTGCTGCC CGGACGCTGG AGATCCCTTT GCCCAATCGT 420
CCCCATTGGT TTCTTTTGTT TGGAGCAACT GAAGAAGAAA TTCAGGAAAT CTGCTTAAAG 480
ATCTTGACGC TTTATGCTCG GAAAAAGGTT GATCTCACAC ACCTGGAGGG TGAAGTGGAA 540
AAAAGAAAGC ACGCTATCGA AGAGGCAAAG GCCCAAGCCC GGGGCCTGTT GCCTGGGGGC 600
ACACAGGTGC TGGATGGTAC CTCGGGGTTC TCTCCTGCCC CCAAGCTGGT GGAATCCCCC 660
AAAGAAGGTA AAGGGAGCAA GCCTTCCCCA CTGTCTGTGA AGAACACCAA GAGGAGGCTG 720
GAGGGCGCCA AGAAAGCCAA GCGGACAGC CCCGTGAACG GCTTGCCAAA GGGGCGAGAG 780
AGTCGGAGTC GGAGCCGGAG CCGTGAGCAG AGCTACTCGA GGTCCTCATC CCGATCAGCG 840
TCTCCTAAGA GGAGGAAAAG TGACAGCGGC TCCACATCTG GTGGGTCCAA GTCGCAGAGC 900
CGCTCCCGGA GCAGGAGTGA CTCCCCACCG AGACAGGCC CCCGCAGCGC TCCCTACAAA 960
GGCTCTGAGA TTCGGGGCTC CCGGAAGTCC AAGGACTGCA AGTACCCCA GAAGCCACAC 1020

AAGTCTCGGA GCCGGAGTTC TTCCCGTTCT CGAAGCAGGT CACGGGAGCG GGCGGATAAT 1080
 CCGGGAAAAT ACAAGAAGAA AAGTCATTAC TACAGAGATC AGCGACGAGA GCGCTCGAGG 1140
 TCGTATGAAC GCACAGGCCG TCGCTATGAG CGGGACCACC CTGGGCACAG CAGGCATCGG 1200
 AGGTGAGGCG GGGTTGCAGT GACTGGTGGC CGCAAGCCCT TCCCTGGGGA GTACCTGATG 1260
 5 GCTGCCCTTT GACCCCCGGT GGCTGCCCTT TGACCCCCGG GTGTGCTCTC AGCGCAAGTG 1320
 GTCCTAGAAC AGGATTCTTT TTGGAAATGT CTGTCGACTG GACCTTGGTG GATTTGAAA 1380
 TGGAAGTGAAG GGACCGGTGA CACGTGCTTC AGACCGGTCT GGGGTGCGGC GCACACCTGG 1440
 GCCCGTGAG GGCTCAGCTC GGCAGCAGCT CTGAGGGCAG CTAATGAAA AAGTGAATGC 1500
 ACACGCCCTT GTTGGCGTGG CCTGGCATGG CCTGGTGCTA TCGGCAGCCG CTCTCCACTC 1560
 10 CCCGACTGAT ACTCAATTAC GTGAAGCCAA GAAAGATGAT TTTTAGAACC TTTGCCTATA 1620
 TTAGGTTGTA CTTATGTACA TATTTGCAG TGTTCACAG GAGAAAGTGG CCTTAAGTGC 1680
 CCCTTATTCT CTCTCCACGT TGTAATAAAA CATGTGTTTA ATACAAGTTA AAGCTATGTA 1740
 TGAAAAGTCA GAACTTGAAT CCCGTCAGCT TAAAGTTGT GTAGGGAATC CTGACTTTTA 1800
 AAATGTGAGG GTATTTGGAT CTGTGTTGAA AGTCGTATAT TTTTATCTGT GCGGTGCTGA 1860
 15 GTGCAGGCCA CCAGCTCCTA AATAGAGGTT CCCTATATGC GCGTATGACA TGGTGAATAA 1920
 ACACAACTCT CTCCACTC 1938

(2)SEQ ID NO: 2的信息:

(i)序列特征:

- 20 (A)长度: 298个氨基酸
 (B)类型: 氨基酸
 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 多肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 2:

25 Met Asn Asp Ser Leu Arg Thr Asp Val Phe Val Arg Phe Gln Pro 15
 Glu Ser Ile Ala Cys Ala Cys Ile Tyr Leu Ala Ala Arg Thr Leu 30
 Glu Ile Pro Leu Pro Asn Arg Pro His Trp Phe Leu Leu Phe Gly 45
 Ala Thr Glu Glu Glu Ile Gln Glu Ile Cys Leu Lys Ile Leu Gln 60
 Leu Tyr Ala Arg Lys Lys Val Asp Leu Thr His Leu Glu Gly Glu 75
 30 Val Glu Lys Arg Lys His Ala Ile Glu Glu Ala Lys Ala Gln Ala 90
 Arg Gly Leu Leu Pro Gly Gly Thr Gln Val Leu Asp Gly Thr Ser 105
 Gly Phe Ser Pro Ala Pro Lys Leu Val Glu Ser Pro Lys Glu Gly 120
 Lys Gly Ser Lys Pro Ser Pro Leu Ser Val Lys Asn Thr Lys Arg 135
 Arg Leu Glu Gly Ala Lys Lys Ala Lys Ala Asp Ser Pro Val Asn 150
 35 Gly Leu Pro Lys Gly Arg Glu Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg 165
 Glu Gln Ser Tyr Ser Arg Ser Pro Ser Arg Ser Ala Ser Pro Lys 180
 Arg Arg Lys Ser Asp Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly Ser Lys Ser 195
 Gln Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Asp Ser Pro Pro Arg Gln Ala 210
 Pro Arg Ser Ala Pro Tyr Lys Gly Ser Glu Ile Arg Gly Ser Arg 225

Lys Ser Lys Asp Cys Lys Tyr Pro Gln Lys Pro His Lys Ser Arg 240
 Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Glu Arg Ala 255
 Asp Asn Pro Gly Lys Tyr Lys Lys Lys Ser His Tyr Tyr Arg Asp 270
 Gln Arg Arg Glu Arg Ser Arg Ser Tyr Glu Arg Thr Gly Arg Arg 285
 5 Tyr Glu Arg Asp His Pro Gly His Ser Arg His Arg Arg 298

(2)SEQ ID NO:3的信息

(i)序列特征

- 10 (A)长度: 29碱基
 (B)类型: 核酸
 (C)链性: 单链
 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO:3:

15 GGGAAAAGTA AAGTTAAAGT CGGTTCTCT 29

(2)SEQ ID NO:4的信息

(i)序列特征

- 20 (A)长度: 29碱基
 (B)类型: 核酸
 (C)链性: 单链
 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO:4:

25 GAGTGGAGAG AGTTGTGTTT ATTCACCATG 30

(2)SEQ ID NO:5的信息

(i)序列特征

- 30 (A)长度: 31碱基
 (B)类型: 核酸
 (C)链性: 单链
 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO:5:

35 CATATGATGA ACGACAGCCT TCGCACCGAC G 31

(2)SEQ ID NO:6的信息

(i)序列特征

(A)长度: 33碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

5 (ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO:6:

GGATCCAACC CCGCCTCACC TCCGATGCCT GCT

33

(2)SEQ ID NO:7的信息:

10 (i)序列特征:

(A)长度: 15个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 多肽

15 (xi)序列描述: SEQ ID NO:7:

Met Asn Asp Ser Leu Arg Thr Asp Val Phe Val Arg Phe Gln Pro

15

(2)SEQ ID NO:8的信息

(i)序列特征

20 (A)长度: 26碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

25 (xi)序列描述: SEQ ID NO:8:

CGGTGCGAAG GCTGTCGTTT ATGTAA

26

(2)SEQ ID NO:9的信息

(i)序列特征

30 (A)长度: 26碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

35 (xi)序列描述: SEQ ID NO:9:

TTACATGAAC GACAGCCTTC GCACCG

26

权 利 要 求 书

- 1、一种分离的人的类帕内特氏细胞增强表达蛋白PCEELP，其特征在于，它包括：具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列的多肽、或其多肽的片段、类似物或
5 衍生物。
- 2、如权利要求1所述的多肽，其特征在于，它是具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列的多肽或其氨基酸变异不超过 5 % 的衍生物。
- 3、如权利要求2所述的多肽，其特征在于，它是具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列的多肽。
- 10 4、一种分离的多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸是选自下列之一组：
(a)编码具有SEQ ID NO.2所示氨基酸序列的多肽或其片段、类似物、衍生物的多核苷酸；
(b)与多核苷酸(a)互补的多核苷酸。
(c)与(a)或(b)有至少70%相同性的多核苷酸。
- 15 5、如权利要求4所述的多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸是编码具有SEQ ID NO.2所示氨基酸序列的多核苷酸。
- 6、如权利要求4所述的多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸的序列是具有SEQ ID NO.1中310-1206位的序列或具有SEQ ID NO.1中1-1938位的序列。
- 7、一种含有外源多核苷酸的重组载体，其特征在于，它是由要求4、5或6所
20 述多核苷酸与质粒、病毒或运载体表达载体构建而成的重组载体。
- 8、一种含有外源多核苷酸的遗传工程化宿主细胞，其特征在于，它是选自于下列一种宿主细胞：
(a)用权利要求7所述的重组载体转化或转导的宿主细胞；
(b)用要求4、5或6所述多核苷酸转化或转导的宿主细胞。
- 25 9、一种具有PCEELP活性的多肽的制备方法，其特征在于，所述方法包括：
(a)在表达PCEELP条件下，培养权利要求8所述的工程化宿主细胞；
(b)从培养物中分离出具有PCEELP活性的多肽。
- 10、一种能与多肽结合的抗体，其特征在于，所述抗体是能与PCEELP特异性结合的抗体。
- 30 11、一类模拟或调节多肽活性或表达的化合物，其特征在于，它们是模拟PCEELP的活性化合物，或促进PCEELP的活性的化合物，或拮抗PCEELP的活性的化合物，或抑制PCEELP的活性的化合物。

12、如权利要求11所述的化合物，其特征在于，它是SEQ ID NO .1所示的多核苷酸序列或其片段的反义序列。

13、一种权利要求11所述化合物的应用，其特征在于，所述化合物用于调节PCEELP在体内、体外活性的方法。

5 14、一种检测与权利要求1、2或3所述多肽相关的疾病或疾病易感性的方法，其特征在于，是间接或直接检测所述多肽表达量，或者是间接或直接检测所述多肽活性，或者是直接或间接检测多核苷酸中引起所述多肽表达量或活性异常的核苷酸变异。

10 15、如权利要求1、2或3所述多肽的应用，其特征在于，它应用于筛选PCEELP的模拟物、激动剂，拮抗剂或抑制剂；或者用于肽指纹图谱鉴定。

16、如权利要求4、5或6所述的核酸分子的应用，其特征在于，它作为引物用于核酸扩增反应，或者作为探针用于杂交反应，或者用于制造基因芯片或微阵列。

15 17、如权利要求1、2、3、4、5或6所述的多肽和多核苷酸的应用，其特征在于，用所述多肽、多核苷酸或其模拟物、激动剂、拮抗剂或抑制剂以安全有效量与药学上可接受的载体组成作为诊断或治疗与PCEELP异常相关的疾病的药物组合物。

20 18、权利要求1、2、3、4、5或6所述的多肽或多核苷酸的应用，其特征在于，用所述多肽或多核苷酸制备用于调节细胞增殖和促进组织再生，治疗癌症、结肠息肉病、肠道菌落混乱、细胞信号传导紊乱所引起疾病的药物。

相同性 = 146/163 (89%), 相似性 = 151/163 (92%)

Query: 137 LEGAKKAKADSPVNGLPKGRESRSRSREQSYSRSPSRASPKRRKSDSGSTSGGSKSQ 196
+EG KKA+ SPVNGL KG+ESRS+SRSREQSYSRSPSRASPKRRKSDSGSTSGGSKSQ
Sbjct: 1 MEGPKKAQGHSPVNGLLKGQESRSQSRREQSYSRSPSRASPKRRKSDSGSTSGGSKSQ 60

Query: 197 SRSRSRSDSPPRQAPRSAPYKGSEIRGSRKSKDCKY-PQPHKSRSRSSSRSRSRERA 255
SRSRSRSDSPPRQ R APYKGSE+RGSRKSKDCKY QKPHKSRSRSSSRSRSRER
Sbjct: 61 SRSRSRSDSPPRQVHRGAPYKGSEVRGSRKSKDCKYLTQKPHKSRSRSSSRSRSRER 120

Query: 256 DNP GYKKKSHYYRDQRRERSRSYERTGRRYERDHPGHSRHRR 298
DN GYKKKSHYYRDQRRERSRSYERTG RYERDHPGHSRHRR
Sbjct: 121 DNSGYKKKSHYYRDQRRERSRSYERTGHR YERDHPGHSRHRR 163

图 1

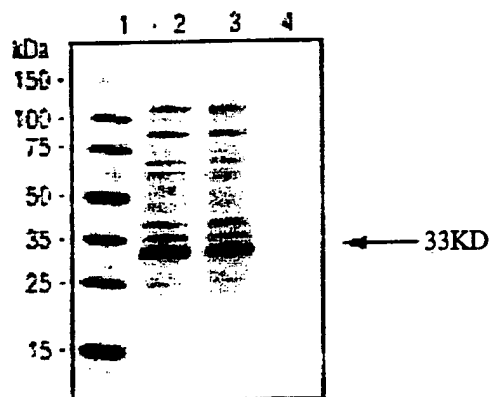


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.
PCT/CN00/00479

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C07K14/435, A61K38/17

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C07K, C12N, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, Genbank, EMBL, DDBJ, SwissProt, PDB, CNPAT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
A	Anat. Rec. 244(1), 1996 Pages 78-94 Cheng, H. And Bjerknes, M. "Patterns of gene expression along the crypt-villus axis in mouse jejunal epithelium" See the whole document.	1-12, 15-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 March 2001(05.03.01)

Date of mailing of the international search report

08 MAR 2001 (08.03.01)

Name and mailing address of the ISA/

The Chinese Patent Office
6, Xitucheng Road, Haidian District,
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

CHANG,mao

Telephone No. 86-10-62093906

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN00/00479**Box I. Observations where certain claims were found unsearchable(Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13, 14
because they relate to subject matter not required to be searched by Authority, namely:
methods for the diagnosis and treatment of diseases
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II. Observations where unity of invention is lacking(Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国际检索报告

PCT申请号

PCT/CN00/00479

A. 主题的分类

IPC⁷ C07K14/435, A61K38/17

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC⁷ C07K, C12N, A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI, Genbank, EMBL, DDBJ, SwissProt, PDB, CNPAT

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
A	Anat. Rec. 244(1), 1996 年 第 78—94 页 Cheng, H 和 Bjerknes, M “鼠空肠上皮的绒毛隐窝体轴的基因表达形式” 见全文	1-12, 15-18

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件

“E” x 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的

“L” 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引

用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

“P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

“T” 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不

相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件: 当该文件被单独使用时, 要求保护的发

明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

“Y” 特别相关的文件: 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结

合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要

求保护的发明不能认为具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

05.3 月 2001(05.03.01)

国际检索报告邮寄日期

05 3A 2001 (05.03.01)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国专利局

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号:

86-10-62019451

授权官员

常 矛

电话号码: 86-10-62093906

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN00/00479

第I栏 认为某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第1项)

因下列原因按条约17(2)(a)就某些权利要求而言不作出国际检索报告:

1. ☒ 权利要求编号: 13, 14
因为它们涉及到不要求本单位检索的主题, 即: 疾病的诊断和治疗方法
2. ☐ 权利要求编号:
因为它们涉及到国际申请中一部分, 而这些内容不符合规定的要求以至于不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:
3. ☐ 权利要求编号:
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句要求撰写。

第II栏 缺乏发明单一性的意见(接第1页第2项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出值得要求附加费的劳动, 全部可作检索的权利要求都能够被检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分所要求的附加检索费, 本国际检索报告仅针对已缴费的那些权利要求。具体说明权利要求编号:
4. ☐ 申请人未按时缴纳所要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首先提到的发明; 涉及该发明的权利要求编号是:

关于异议的说明:

- ☐ 随附加检索费附有申请人的异议书。
☐ 随附加检索费的支付没有任何异议书。